

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Katedra biochemie**



REKOMBINANTNÍ EXPRESE RECEPTORU

IMUNOGLOBULINOVÉ RODINY NKp30

*Recombinant expression of immunoglobulin superfamily receptor NKp30*

Bakalářská práce

Konzultant práce: RNDr. Hynek Mrázek, Ph.D.

Školitel: RNDr. Daniel Kavan, Ph.D.

Praha 2013

Lucie Tůmová

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Daniela Kavana, Ph.D. a konzultanta RNDr. Hynka Mrázka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 16. května 2013.

.....

podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému konzultantovi RNDr. Hynku Mrázkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady bezmeznou trpělivost a MALDI-TOF MS měření a RNDr. Danielu Kavanovi, Ph.D. za umožnění vypracování bakalářské práce. Dík patří i ostatním členům Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu vždy poradit a pomoci. V neposlední řadě patří mé poděkování rodině a blízkým, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

## ABSTRAKT

NK buňky patří mezi lymfocyty přirozeného imunitního systému, které jsou schopné cytotoxicky usmrtit některé nádorové a viry infikované buňky, produkovat cytokiny a účastnit se tvorby adaptivní imunitní odpovědi. Tato bakalářská práce se zabývá lidským receptorem NK buněk, receptorem NKp30. Tento protein se řadí mezi aktivační receptory, které jsou schopny aktivovat cytotoxickou funkci NK buněk. Jeho trojrozměrná struktura a interakce mezi NKp30 a jeho fyziologickým ligandem B7-H6 byla nedávno rozřešena, nicméně interakce s jeho ostatními ligandy, BAT3 a pp65, vyřešena nebyla. Cílem práce bylo optimalizovat produkci extracelulární domény receptoru NKp30 v prokaryotickém expresním systému. Strukturní studie tohoto proteinu mohou poskytnout další detaily o interakci mezi receptorem NKp30 a jeho ligandy BAT3 a pp65.

NK cells belong to lymphocytes, which are able to kill some tumor cells and virus-infected cells, produce cytokines and participate in the formation of the adaptive immune response. This bachelor thesis deals with human receptor of NK cells, specifically NKp30. This protein belongs to the group of activating receptors which can activate the cytotoxic function of NK cells. Its three-dimensional structure and the interaction between NKp30 and its physiological ligand B7-H6 has been recently resolved. However the interaction with the other ligands, BAT3 and pp65, remains unknown. The aim of the work was optimalization of expression of the NKp30 receptor extracellular domain in prokaryotic expression system. The structural studies with ligands of this protein may provide further details on the interaction between the receptor NKp30 and ligands BAT3 and pp65. (In Czech)

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

NK buňky

receptory NK buněk

receptor NKp30

rekombinantní exprese

# OBSAH

PROHLÁŠENÍ .....	2
PODĚKOVÁNÍ .....	2
ABSTRAKT .....	3
KLÍČOVÁ SLOVA .....	4
OBSAH .....	5
SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	7
SYMBOLY .....	7
ZKRATKY .....	7
1. LITERÁRNÍ ÚVOD .....	9
1.1 Imunitní systém .....	9
1.2 Složky imunitního systému .....	10
1.3 Zásady fungování imunitního systému .....	12
1.4 NK buňky .....	12
1.5 Receptory NK buněk .....	15
1.5.1 Receptor NKp30 .....	17
2 CÍL PRÁCE .....	19
3 MATERIÁL .....	20
3.1 Přístroje a pomůcky .....	20
3.2 Chemikálie .....	21
3.3 Enzymy .....	22
3.4 Bakteriální kmeny <i>E. coli</i> .....	22
3.5 Roztoky a pufrý .....	23
3.6 Média .....	23
4 METODY .....	24
4.1 Bakteriální transformace .....	24
4.2 Testování exprese .....	24
4.3 SDS- PAGE .....	25
4.4 Elektropřenos na membránu .....	26
4.5 Optimalizace produkce proteinu .....	27
4.6 Velkoobjemová produkce .....	27
4.7 Izolace inkluzních tělísek .....	28
4.8 Renaturace proteinu .....	29

4.9 Gelová chromatografie na Superdexu 75 .....	29
4.10 Stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové.....	30
5. VÝSLEDKY.....	32
5.1 Bakteriální transformace.....	32
5.2 Testování exprese .....	32
5.3 Identifikace produkovaného proteinu .....	33
5.4 Optimalizace produkce proteinu.....	35
5.5 Velkoobjemová produkce a izolace inkluzních tělísek.....	35
5.6 Renaturace proteinu a gelová chromatografie na Superdexu 75.....	36
5.7 Stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové.....	38
6. DISKUZE .....	40
7. ZÁVĚR .....	42
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	43

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

### SYMBOLY

<b>A</b>	absorbance
<b>c</b>	koncentrace ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , $\text{mg}/\text{ml}$ , $\text{mol}/\text{l}$ )
<b>t</b>	čas (min)
<b>T</b>	teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )
<b>V</b>	objem (ml, $\mu\text{l}$ )

### ZKRATKY

<b>ADCC</b>	cytotoxická reakce závislá na protilátkách (Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity)
<b>APCs</b>	antigen prezentující buňky (Antigen Presenting Cells)
<b>APS</b>	peroxodisíran amonný (Amonium PerSulfate)
<b>DC</b>	dendritická buňka (Dendritic Cell)
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>GM-CSF</b>	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor)
<b>HLA</b>	lidský leukocytární antigen (Human Leukocyt Antigen)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>IPTG</b>	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
<b>ITAM</b>	aktivační motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (Immunoreceptor Tyrosine- based Activation Motif)
<b>ITIM</b>	inhibiční motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)
<b>KIRs</b>	inhibiční receptory imunoglobulinového typu NK buněk (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors)
<b>LB medium</b>	Luria Bertani / Lysogeny broth medium
<b>LGLs</b>	velké granulární lymfocyty (Large Granular Lymphocytes)
<b>LILRs</b>	inhibiční receptory imunoglobulinového typu leukocytů (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors)

<b>MALDI</b>	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
<b>MALT</b>	slizniční lymfatická tkáň (Mucous Associated Lymphoid Tissue)
<b>MBÚ AV ČR, v. v. i.</b>	Mikrobiologický ústav Akademie věd České Republiky, veřejná výzkumná instituce
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
<b>NCRs</b>	přirozené cytotoxické receptory (Natural Cytotoxic Receptors)
<b>NK</b>	přirozený zabíječ (Natural Killer)
<b>PAGE</b>	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PolyAcrylamide Gel Electroforesis)
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonyl fluorid
<b>PVDF</b>	polyvinyliden difluorid
<b>RPM</b>	otáčky za minutu (Revolutions Per Minute)
<b>SDS</b>	dodecylsírán sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)
<b>SHP-1</b>	Src homologní fosfatasa-1 (Src Homology Phosphatase-1)
<b>SHP-2</b>	Src homologní fosfatasa-2 (Src Homology Phosphatase-2)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TNF (-α, -β)</b>	faktor nekrotizující nádory -alfa, -beta (Tumor Necrosis Factor -alfa, -beta)
<b>TOF</b>	doba letu částice (Time Of Flight)
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)aminometan



# 1. LITERÁRNÍ ÚVOD

## 1.1 Imunitní systém

Více než 400 miliónů let trvalo našemu imunitnímu systému se rozvinout do dnešní složitosti a vyvinout adaptabilní obranný mechanismus [1]. Imunitní systém udržuje celistvost organismu tím, že rozpoznává škodlivé látky od neškodných. Obrana organismu tedy spočívá v ochraně před škodlivinami vnějšího i vnitřního prostředí [2]. Tyto škodliviny mohou být například mikroorganismy, toxiny a maligní buňky [1].

Tři hlavní funkce imunitního systému jsou jeho obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled. Obranyschopnost je schopnost organismu rozpoznávat vnější škodliviny a chránit organismus před patogenními mikroorganismy a jejich toxickými produkty. Autotolerance je schopnost imunitního systému rozpoznávat vlastní tkáně organismu a vůči nim udržovat toleranci. Pokud dojde k narušení tolerance, vzniká autoimunitní onemocnění. Imunitní dohled znamená, že imunitní systém průběžně odstraňuje staré, poškozené a některé pozměněné buňky [2].

Existují dvě základní skupiny imunitních mechanismů: nespecifické (neadaptivní) a antigenně specifické (adaptivní). Obě skupiny mohou být dále rozděleny na složky humorální a buněčné. Humorální složka imunitních mechanismů představuje různé sérové proteiny a sekretované molekuly. Buněčná složka imunitních mechanismů je tvořena různými typy buněk. Oba tyto imunitní mechanismy jsou nepostradatelné a vzájemně kooperují [2].

Přirozená imunita (neadaptivní, nespecifická, vrozená) je evolučně starší a představuje první linii obrany organismu. Reaguje na společné strukturní nebo funkční rysy skupin různých patogenů. Buněčná složka je tvořena fagocytujícími buňkami (neutrofily, makrofágy), NK buňkami a dendritickými buňkami. Humorální složka je prezentována komplementovým systémem, interferony, lektiny, cytokiny a jinými sérovými proteiny. Součástí přirozené imunity jsou také neimunitní obranné mechanismy jako neporušený povrch pokožky a sliznic, mastné kyseliny na kůži, pohyb řasinek a nepatogenní flóra na epitelech [1, 3].

Adaptivní imunita (antigenně specifická) je evolučně mladší a je založena na přítomnosti vysoce specifických receptorů pro jisté regiony (epitopy) patogenů [1].

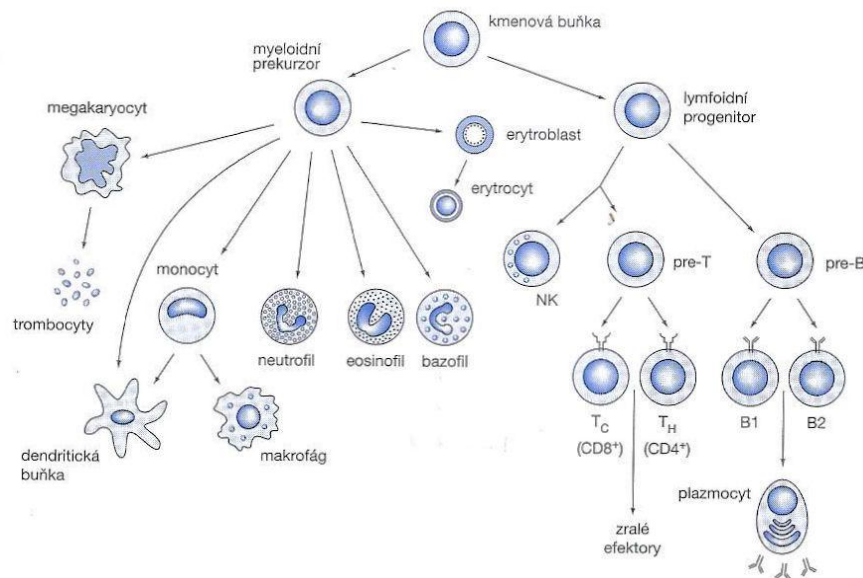
Buněčná složka adaptivní imunity je založena na T a části B lymfocytů. B lymfocyty sekretují vysoce specifické protilátky [2, 3]. Významný vliv antigenně specifické imunity je imunologická paměť. Což znamená, že po dalším setkání se stejným antigenem následuje rychlejší a efektivnější odpověď. Pro rozvinutí specifické reakce je zapotřebí několik dní až týdnů [1, 2].

## **1.2 Složky imunitního systému**

Buňky přirozeného a adaptivního imunitního systému jsou normálně přítomny jako cirkulující buňky v krvi a lymfě, jako anatomicky definované soubory v lymfatických orgánech a tkáních, a jako roztroušené buňky prakticky ve všech tkáních [2, 3]. Nejen na buňkách je založena funkce imunitního systému, ale také na specifických molekulách a jejich vzájemných interakcích [2].

Místa vzniku, diferenciaci a zrání imunokompetentních buněk se nazývají primární lymfatické orgány. Tyto orgány jsou např. kostní dřeň, thymus a u ptáků Fabriciova burza. Slezina, lymfatické uzliny a jejich shluky patří do sekundárních lymfatických orgánů. Navíc sem náleží také rozptýlená lymfatická tkáň, zejména představovaná slizniční lymfatickou tkání (MALT) [2]. Sekundárními lymfatickými orgány protéká krev a lymfa s antigeny z celého těla. Tyto antigeny jsou vystaveny na povrchu APCs a rozpoznávány specifickými lymfocyty v lymfatických orgánech. Toto je první krok adaptivní imunity [3].

Všechny komponenty krve, včetně buněk imunitního systému, vznikají z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk nacházejících se v kostní dřeni [1]. Kmenové buňky se v malém množství udržují po celý život [2]. Vlivem různých rozpustných mediátorů (cytokinů) a signálů při kontaktu se stromálními buňkami dojde k jejich diferenciaci na různé druhy krevních buněk (obr. 1, str. 11) [1]. Veliká část imunitního systému je představována různými druhy bílých krvinek, leukocytů. Z kmenových buněk vznikají dvě základní linie, myeloidní a lymfoidní.



**Obr. 1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky [2]**

Z myeloidní linie se vytváří monocyty (které se při vstupu z krve do tkání mění na makrofágy) a tři druhy granulocytů: neutrofil, bazofil a eosinofil. Žírné buňky jsou bazofily nacházející se v tkáni. Do této linie patří také dendritické buňky. Tato skupina tvoří základ pro nespecifickou imunitu, protože většina těchto buněk je schopná fagocytovat a produkovat cytokiny. DCs, monocyty a makrofágy mají důležitý úkol fungovat jako APCs pro T lymfocyty, čímž se stávají součástí adaptivní imunity [2, 3].

Z lymfoidní linie vznikají NK buňky, T a B lymfocyty. B-lymfocyty se vyvíjí v kostní dřeni a po setkání s antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech se z nich stávají plazmatické buňky produkující protilátky. Podstatná část vývoje T lymfocytů probíhá v thymu, který opouští dvě fenotypově odlišné subpopulace: prekurzory pomocných T buněk s receptorem CD4 na povrchu a prekurzory cytotoxických T buněk s receptorem CD8 na povrchu. Tyto dvě subpopulace se po setkání s antigenem diferencují na zralé efektorové buňky. Z části populace B a T lymfocytů se stávají paměťové buňky odpovědné za imunologickou paměť [2]. Rozsáhlý soubor individuálních klonů receptorů T a B lymfocytů vzniká nahodilým přeskupováním genů kódujících variabilní úseky receptorů [1].

Základní molekuly imunitního systému jsou buď součástí membrán buněk, nebo jsou buňkami sekretovány. Těmito molekulami jsou MHC glykoproteiny I. a II. třídy (u lidí

nazývané HLA), antigenně specifické receptory na povrchu T a B lymfocytů, Fc receptory (vážající Fc části molekul imunoglobulinů), adhezivní a kostimulační molekuly, imunoglobuliny, cytokiny a jejich receptory a složky komplementového systému [2].

### **1.3 Zásady fungování imunitního systému**

Nejdříve se obranných reakcí účastní nespecifické mechanismy, které hlavně rozpoznávají chemické struktury specifické pro mikroorganismy. Když organismus rozpozná takové cizorodé struktury, dojde k aktivaci efektorových mechanismů různých buněk, hlavně fagocytů, a také komplementu, které cizorodý mikroorganismus zničí. Některé typy fagocytů slouží jako APCs, proto následně spouští antigenně specifické mechanismy. Důležitou roli mají MHC molekuly, které vystavují na povrchu APC části pohlcených proteinů [2].

Antigenně specifické mechanismy jsou postaveny na klonální selekční hypotéze, která vysvětluje, jak může imunitní systém odpovídat na velká množství rozdílných antigenů [3]. V organismu se nacházejí velká množství lymfocytů, které se od sebe odlišují strukturou vazebných míst receptorů. To zvyšuje šanci k silnému navázání určitého antigenu. V případě setkání antigenu s lymfocyty nesoucími příslušný receptor, dojde k jejich pomnožení. Tyto pomnožené buňky se stejnou specifitou se nazývají klony. Ty následně eliminují antigen. K aktivaci lymfocytů nestačí pouze tato interakce s antigenem, ale také kostimulační signál od APCs. Tento princip se označuje jako druhý signál. Pokud ten chybí, dochází k funkčnímu útlumu nebo apoptóze lymfocytu [2, 3].

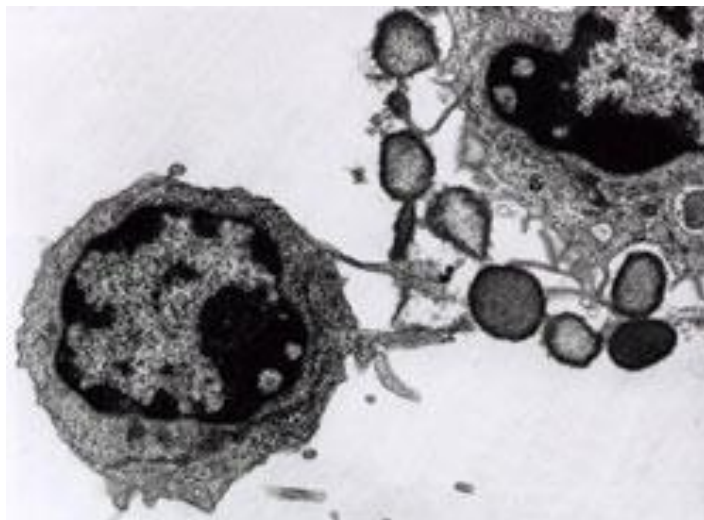
Ovšem celková imunitní odpověď je dána součtem nespecifických a antigenně specifických imunitních mechanismů [2].

### **1.4 NK buňky**

Původně byly NK buňky popsány jako velké granulární lymfocyty (LGLs) s přirozenou cytotoxicitou proti nádorovým buňkám bez přítomnosti antigenně specifických receptorů [4]. Později došlo k uveřejnění objevu NK buněk u myši v roce 1975 R. Kiesslingem a H. Prossem [4, 5]. H. Pross následně potvrdil přítomnost NK buněk i u lidí [6]. NK buňky byly popsány jako speciální typ lymfocytů odpovědný za přirozenou cytotoxicitu a produkci cytokinů [4, 5]. NK buňky jsou tedy lymfocyty přirozeného imunitního systému, které dokážou zabít cílové buňky, produkovat cytokiny, a účastní se vytváření adaptivní imunitní

odpovědi [7]. Hlavní rys NK buněk je v jejich schopnosti rozlišovat mezi stresovanými buňkami (jako jsou nádorové buňky, virově infikované buňky a buňky, které utrpěly fyzikální nebo chemické poškození) a zdravými buňkami pomocí sady rozpoznávacích zárodečně kódovaných receptorů [8].

NK buňky pocházejí z hematopoietických kmenových buněk a zaujímají 5 až 15% všech lymfocytů [2]. Vyskytují se hlavně v krvi, slezině, plicích, játrech a u těhotných žen v děložní sliznici. Z těchto míst podle potřeby migrují do tkání [3]. Životnost lidských NK buněk v krvi je přibližně 2 týdny [9]. Jak již bylo řečeno, NK buňky jsou morfologicky granulární lymfocyty (obr. 2, str. 13), s velkým množstvím cytotoxických granulí [4]. Protože tato skupina lymfocytů nemá receptory specifické pro antigen, v imunitní odpovědi NK buňky používají jiný mechanismus. Rozpoznávají například buňky, které mají na svém povrchu nedostatek MHC glykoproteinů I. třídy [2, 7].



**Obr. 2: NK buňka zabíjející nádorovou buňku [10].** Vlevo NK buňka zabíjí nádorovou buňku pomocí cytotoxických váčků.

Úkolem MHC glykoproteinů na povrchu všech buněk je rozlišovat tělu vlastní a cizí antigeny. MHC glykoproteiny, lidské se nazývají HLA, prezentují imunitnímu systému krátké peptidy, které slouží jako antigeny. Podle původu antigenu se MHC molekuly dělí do dvou tříd. MHC molekuly I. třídy prezentují proteiny produkované buňkou a MHC molekuly II. třídy prezentují proteiny pohlcené buňkou [2]. Pokud má buňka na svém povrchu nedostatek těchto MHC molekul I. třídy, tak převáží aktivační signál a NK buňka se aktivuje. Při aktivaci dochází k vyloučení cytotoxických granulí, které obsahují perforin a proteasy granzymy do synaptické štěrby. Perforin vytvoří póry v cytoplazmatické

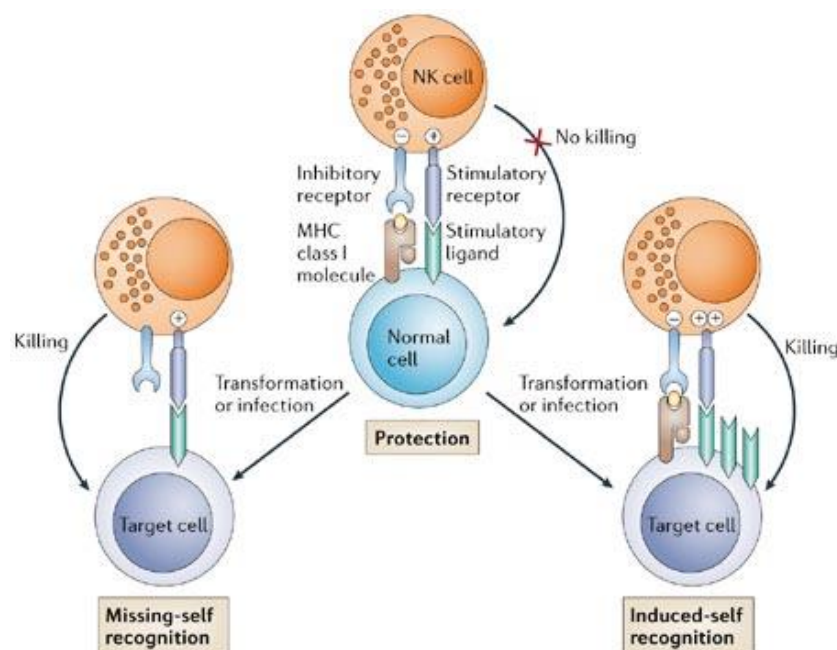
membráně cílové buňky a granzymy indukují apoptózu (buněčnou smrt). Snížením počtu MHC molekul I. třídy se nádorové buňky snaží zabránit rozpoznání T lymfocyty. Lidský organismus si ale vyvinul mechanismus přes rozpoznání NK buňkami. [2, 3].

NK buňky produkují také určité množství cytokinů jako IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , GM-CSF a další. Čímž regulují přirozenou i adaptivní imunitu. K významnému vzájemnému ovlivňování pomocí cytokinů dochází s fagocyty buňkami, obzvláště s DCs. NK buňky buď mohou zničit nezralé DCs a tím ovlivňovat jejich homeostázu, nebo řídit zrání DCs produkcí IFN- $\gamma$  a TNF. To dokazuje, že NK buňky mají také regulační funkci. DCs mohou aktivovat NK buňky pomocí IL-12. T lymfocyty produkují IL-2, který stimuluje aktivitu NK buněk. [7, 11, 12, 13].

V současné době existuje několik hypotéz, které se snaží objasnit, jakým způsobem dochází k rozpoznávání cílových buněk (nádorových nebo viry infikovaných) NK buňkami.

Základní hypotéza se nazývá „non-self recognition“. Udává schopnost NK buněk rozpoznávat své cíle skrz skupiny aktivačních a inhibičních receptorů, které rozpoznávají patogenní molekuly [11].

Jedna z hlavních hypotéz se jmenuje „missing self recognition“ (obr. 3, str. 15). Tato hypotéza je založena na NK buněčném rozpoznávání nedostatečného množství MHC glykoproteinů I. třídy na povrchu cílových buněk. Tímto snížením exprese MHC molekul se snaží buňky vyhnout lyzi zprostředkovanou CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. U zdravých buněk, s dostatečným počtem MHC molekul I. třídy na buněčném povrchu se interakcí inhibičních receptorů s MHC molekulami I. třídy aktivují cytoplazmatické fosfatázy, které ruší signalizační dráhy zahájené stimulačními receptory. Celkově tato kaskáda vede k inhibici cytotoxické funkce. Proto při kontaktu s buňkami se sníženou expresí MHC glykoproteinů I. třídy dojde u NK buněk k tomu, že aktivační signály převáží množství inhibičních a dojde k lyzi cílových buněk. Jak je zřejmé, záleží na převaze inhibičních nebo aktivačních signálů u NK buněk [2, 8, 14, 15].



Obr. 3: Názorné zobrazení dvou hypotéz rozpoznání cílových buněk (Missing-self recognition a Induced-self recognition) [14]

Další hypotéza je pojmenována „induced self recognition“ (obr. 3, str. 15). Ta je založena na tom, že NK buňky rozpoznávají buňky se zvýšenou expresí vlastních proteinů, které se vlastně stávají ligandy aktivačních receptorů. Tento jev je pozorován u nádorově transformovaných a infikovaných buněk. Tyto interakce mezi aktivačními receptory na NK buňkách s jejich ligandy mohou vyvolat cytotoxický mechanismus, jestliže aktivační signály převáží inhibiční [11, 14].

Poslední možnost, jak může dojít k aktivaci NK buněk je cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC). Většina infikovaných buněk je opsonizována prostřednictvím protilátek typu IgG. Receptor CD16 (FcγRIII) se váže na Fc fragment IgG a tím dojde k signalizační kaskádě vyvolávající cytotoxickou aktivitu NK buněk [4, 16].

## 1.5 Receptory NK buněk

NK buňky na svém povrchu exprimují tři typy receptorů dělených podle své funkce: inhibiční, aktivační a kostimulační receptory [17]. Aktivační receptory poskytují signál, který aktivuje NK buňky k použití cytotoxických mechanismů. To se většinou stává při nedostatku MHC glykoproteinů I. třídy na cílových buňkách. Inhibiční receptory poskytují signál, který inhibuje cytotoxické mechanismy. Tyto inhibiční signály buňka obdrží při

ropoznání MHC glykoproteinů I. třídy [8]. NK buněčná aktivace je regulována rovnováhou mezi signály z aktivačních a inhibičních receptorů [3]. Dalšími molekulami exprimovanými na NK buňkách i ostatních leukocytech jsou kostimulační receptory. Jejich funkce je založena na zvýšení signálu od primárního aktivačního receptoru [8, 17].

Inhibiční receptory mohou být specifické buď pro MHC glykoproteiny I. třídy, nebo mohou vázat jiné ligandy [18]. KIRs (Killer cell immunoglobulin-like receptors) rozpoznávají různé alelické skupiny HLA-A, -B a -C molekul. Zatímco LILRs (Leukocyte immunoglobulin-like receptors) rozpoznávají velká množství alel HLA molekul I. třídy. Receptor CD94- NKG2A rozpoznává molekulu HLA-E. Všechny tyto receptory se odlišují od sebe navzájem extracelulární doménou, ale sdílí běžný inhibiční signální motiv ve svých cytoplazmatických oblastech [8, 18]. V jejich intracelulárních částech se nachází inhibiční motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (ITIM), který je definován sekvencí (I/L/V/S)XYXX(L/V). V této sekvenci X značí libovolné aminokyseliny a lomítka rozdělují aminokyseliny, které se mohou v těchto pozicích nacházet [18]. Když tento receptor naváže ligand, dojde k fosforylaci tyrosinového zbytku kinázami rodiny Src a následně k aktivaci fosfatasy SHP-1 a SHP-2. Tyto fosfatasy defosforylují intracelulární signalizační proteiny, a tím přeruší aktivační signalizační kaskádu zahájenou různými aktivačními receptory [8, 18]. Inhibiční receptory mohou obsahovat i jiné intracelulární inhibiční motivy, nejenom motiv ITIM [18].

NK buňky exprimují na svém povrchu aktivační komplexy, které se skládají z transmembránových aktivačních receptorů asociovaných s adaptorovými proteiny. Nejznámější adaptorové proteiny jsou FcRγ, CD3-ζ, DAP12 a DAP10. Tyto adaptorové proteiny se liší v počtu aktivačních motivů imunoreceptorů založených na tyrosinu (ITAMs) [19]. ITAM je charakterizován sekvencí (D/E)XXYXX(L/I)X<sub>6-8</sub>YXX(L/I), kde X<sub>6-8</sub> označuje 6-8 různých aminokyselin a lomítka rozdělují aminokyseliny, které se v daných pozicích mohou nacházet [18]. DAP12 a FcRγ obsahuje jeden ITAM, a CD3-ζ obsahuje 3 ITAMy na řetězec. Zatímco DAP10 obsahuje motiv YxxM. Všechny adaptorové proteiny obsahují záporně nabitý zbytek kyseliny asparagové v transmembránové oblasti. Tento náboj je vyžadován pro oligomerní formaci [19]. Pro stabilní asociaci receptoru a adaptoru má receptor v transmembránové části opačně nabité aminokyseliny (lysin nebo arginin). Pokud receptor rozpozná aktivační ligand, dojde k fosforylaci tyrosinů v ITAM motivu



pomocí kináz Src rodiny. Po fosforylaci se k podjednotce nesoucí motiv ITAM naváží tyrosin kinázy Syk a ZAP-70. Výsledek této signalizace vede ke spuštění efektorových funkcí buňky [18]. Do aktivačních receptorů patří přirozené cytotoxické receptory (NCs), jako jsou NKp30, NKp44 a NKp46, které jsou specifické pro NK buňky a nejvíce se podílí na rozpoznávání nádorových buněk. Jako další do této skupiny patří NKG2D, který rozpoznává stresem indukované ligandy MICA, MICB a ULBP proteiny. Fc receptorový protein CD16 rozpoznává cílové buňky pokryté protilátkami a tím aktivuje ADCC a produkci cytokinů [8, 19].

Mezi stimulační koreceptory patří například 2B4 a NTB-A [8].

Receptory se mohou dále dělit podle jejich struktury na imunoglobulinové a C-lektinové. Mezi imunoglobulinové receptory se řadí hlavně KIRs, LILRs a NCs. Mezi C-lektinové receptory patří např. receptor CD94/NKG2, CD161/NKRP1 a Ly49 (u myši) [8].

### **1.5.1 Receptor NKp30**

Receptor NKp30 (CD337 nebo NCR3) patří mezi aktivační receptory, konkrétně do skupiny přirozených cytotoxických receptorů. Do této skupiny patří také NKp44 (CD336 nebo NCR2) a NKp46 (CD335 nebo NCR1) [8, 20]. NCRs hrají důležitou roli v lyzi nádorových buněk. NKp30 je specifická povrchová molekula lidských NK buněk a je členem rodiny CD28, do které patří také CTLA-4 a PD-1 [8, 21]. Je to produkt genu 1C7 mapovaném na lidském chromozomu č. 6 v regionu HLA molekul III. třídy [22, 23, 24]. Je selektivně produkován na povrchu klidových i aktivovaných NK buňkách [8].

NKp30 je transmembránový receptor I. typu [21]. Má jednu extracelulární N-koncovou imunoglobulinům podobnou doménu spojenou krátkým „stonkem“ tvořeným šesti aminokyselinami s transmembránovým segmentem, který asociuje s homodimerem CD3 $\zeta$  skrz interakce s nabitými zbytky aminokyselin, a cytoplazmatickou doménou [21, 22, 25].

Ligandy pro NKp30 nebyly dlouho odhaleny [8]. Nicméně, již se podařilo několik z nich identifikovat. Receptor NKp30 se váže na povrchový protein nádorových buněk B7-H6, na jaderný faktor BAT3, který je nepostradatelný pro acetylaci proteinu p53 během buněčné odpovědi na poškozenou DNA, a na protein virového matrixu pp65 lidského cytomegaloviru [20, 21, 26, 27].

Zatímco 3D struktury receptorů NKp44 a NKp46 již byly delší dobu vyřešeny, teprve nedávno, v roce 2011, dvě publikace uveřejnily strukturu NKp30 (obr. 4, str. 18) a jeho komplex s ligandem B7- H6 [21, 25, 28, 29]. Způsob rozpoznání dalších dvou ligandů, BAT3 a pp65, zůstává neznámý [26, 27]. Extracelulární doména lidského receptoru NKp30 byla krystalizována a jeho struktura byla určena molekulárními záměnami [25]. Doména se skládá z osmi  $\beta$ - řetězců tvořících antiparalelní  $\beta$ - listy představované *ABED* a *A'GFC* řetězci. Navíc struktura obsahuje dva  $\alpha$ -helixy. Jeden krátký  $\alpha$ -helix existuje mezi  $\beta$ - řetězci D a E, a druhý dělí smyčku mezi řetězci E a F [25]. Mezi cysteiny 39 a 107 se nachází disulfidová vazba (obr. 4, str. 18) [21].



Obr. 4: Struktura receptoru NKp30 [25]

## 2 CÍL PRÁCE

- rekombinantní expresí připravit protein NKp30 (extracelulární doménu) ke strukturním studiím se svými ligandy
  - připravit extracelulární doménu proteinu NKp30 v prokaryotickém expresním systému
  - optimalizovat podmínky produkce
  - provést *in vitro* renaturaci
  - purifikovat renaturovaný protein

## 3 MATERIÁL

### 3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy AL 54	Mettler Toledo, ČR
Automatické pipety	Gilson, USA
Biologický termostat BT 120M (37°C)	Lab. přístroje Praha
Celulosová membrána (MWCO 10 kDa)	Sigma-Aldrich, USA
Centrifuga Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, USA
Centrifuga J-6M	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Spectrafuge 16M	National Labnet Co., USA
Centrifuga VSMC-13	Shelton scientific, USA
Centrifugační koncentrátor Amicon Ultra	Millipore, USA
Eppendorfovy zkumavky (V = 1,5 ml a V = 0,5 ml)	Trefflab, Švýcarsko
HPLC systém BioSys 510	Beckman Coulter, USA
Kahan	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Kolona Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare, Švédsko
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Monochromátorová čtečka destiček Safire2	Tecan, Švýcarsko
Mrazicí box	Elektrolux, Švédsko
Mrazicí box (-80 °C) Bio Freezer	Forma scientific, USA
Napájecí zdroj EPS 500/400	Pharmacia, USA
Napájecí zdroj MP-250V	Cleaver Scientific, UK
pH metr Φ 200	Beckman, USA
Předvážky HF-1200G	AND, USA
PVDF membrána	Pall Corp., USA
Souprava pro elektropřenos proteinů	Sigma-Aldrich, USA
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
Souprava pro ultrafiltraci	Sigma-Aldrich, USA
Spektrofotometr DU-70	Beckman, USA

Třepačka VSR	Grant Boekel, UK
Třepačka na Erlenmeyerovy baňky	Sanyo Gallenkamp, UK
Třepačka na zkumavky BigGer Bill	Thermolyne, USA
Ultrazvuková lázeň	KRAINTEK, Slovensko
Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710	Cole-Parmer instrum. Co., USA
Ploténkový vaříč	Sencor, Japonsko
Vortex	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA

### 3.2 Chemikálie

Agar	Oxoid, USA
Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
BSA	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Německo
Činidlo pro stanovení dle Bradfordové	Bio-Rad, USA
Dodecylsíran sodný	Jersey Lab Supply, USA
DTT	Sigma-Aldrich, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Lachema, ČR
Glycerol	Lachema, ČR
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid hořečnatý	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Lachema, ČR
IPTG	Sigma-Aldrich, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, ČR
Kyselina octová	Lachema, ČR
L-arginin	Serva, Německo

Leupeptin	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Lachema, ČR
Močovina	Serva, Německo
N,N'-methylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Oxidovaný glutathion	Sigma-Aldrich, USA
Pepstatin	Sigma-Aldrich, USA
Peroxodisíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, USA
Redukovaný glutathion	Sigma-Aldrich, USA
Sacharosa	Lachema, ČR
Standardy pro SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, USA
TEMED	Serva, Německo
Tetracyklin	Jersey Lab Supply, USA
Tris	Serva, Německo
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypton	Oxoid, USA

Všechny použité chemikálie byly čistoty p. a. nebo vyšší.

### 3.3 Enzymy

DNAsa I (deoxyribonukleasa I)	Sigma-Aldrich, USA
RNAsa I (ribonukleasa I)	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin	Promega, USA

### 3.4 Bakteriální kmeny *E. coli*

<b>BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL</b> <i>E. coli</i> B F- <i>ompT hsdS</i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) <i>endA</i> Hte [ <i>argU proL</i> Cam <sup>r</sup> ] [ <i>argU ileY leuW</i> Strep/Spec <sup>r</sup> ]	Stratagene, USA
<b>BL21 (DE3) pLysS</b> <i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS</i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) [pLysS Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene, USA
<b>BL21-Gold (DE3)</b> <i>E. coli</i> B F- <i>ompT hsdS</i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) <i>endA</i> Hte	Stratagene, USA

### 3.5 Roztoky a pufrы

**Barvicí roztok pro polyakrylamidové gely a PVDF membrány:** 0,25 % CBB R-250, 45 % methanol, 10 % kyselina octová

**Elektrodový pufr pro SDS-PAGE:** 10 mM TRIS, 250 mM glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3

**Odbarvovací roztok pro PVDF membrány:** 50 % methanol, 10 % kyselina octová

**Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:** 35 % ethanol, 10 % kyselina octová

**Promývací pufr bez detergentu:** 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkaptoethanol, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4

**Pufr pro elektropřenos proteinů:** 20 % methanol, 80 % SDS elektrodový pufr

**Pufr pro gelovou chromatografii:** 10 mM Hepes pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>

**Pufr s detergentem:** 0,5 % Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkaptoethanol, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4

**Renaturační pufr:** 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,4 M L-arginine, 3 mM redukovaný glutathion, 0,9 mM oxidovaný glutathion, 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 μM leupeptin

**Roztok akrylamidu:** 1 % N,N'-methylen-bis-akrylamid, 29 % akrylamid

**Sacharózový lyzační pufr:** 25 % sacharosa, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4

**2x Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující:** 100 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 0,2 % bromfenolová modř, 20 % glycerol, 200 mM dithiothreitol, pH 6,8

**2x Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující:** 100 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 0,2 % bromfenolová modř, 20 % glycerol, pH 6,8

### 3.6 Média

**LB médium:** 1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH 7,4

**LB agar:** 1,5 % agar v LB médiu

## 4 METODY

### 4.1 Bakteriální transformace

Buňky *E. coli* kmenů BL21(DE3)GOLD, BL21(DE3)RIPL a BL21(DE3)pLysS, které jsou uchovávány při -80 °C, byly ponechány rozmrazit na ledu. Do tří připravených mikrozkušavek s 200 µl rozmražených buněk bylo přidáno 0,5 µl plasmidu pNKp30, o koncentraci 1 µg/µl, nesoucí gen pro NKp30 ve vektoru pET30a+, který byl zakoupen od firmy Generay Biotech Co., Ltd.. Do čtvrté mikrozkušavky bylo přidáno pouze 200 µl rozmražených buněk kmene BL21(DE3)RIPL. Tento vzorek sloužil jako negativní kontrola, která nám potvrdila, že na miskách s LB agarem nerostly netransformované bakterie. Následně byly mikrozkušavky s buňkami inkubovány 30 minut na ledu. Po uplynutí této doby byly mikrozkušavky ponořeny na 45 s do horké vodní lázně o teplotě 42 °C a ihned přeneseny na 1 minutu do nádoby s ledem. Dále bylo přidáno 800 µl LB média bez antibiotik do všech mikrozkušavek, včetně kontrolní. Ty byly na 1 h vloženy do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C. Následně byla provedena centrifugace při 1 500×g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Bylo odebráno 700 µl supernatantu z každé mikrozkušavky a ve zbytku byly pelety resuspendovány. Pomocí 50 µl resuspendovaných bakterií byly zaočkovány předem připravené misky s LB agarem s příslušnými antibiotiky, kanamycinem (výsledná koncentrace 50 µg/ml) a tetracyklinem (výsledná koncentrace 12,5 µg/ml). Misky s LB agarem s transformovanými bakteriemi i miska kontrolní byly umístěny na noc do termostatu nastaveného na 37 °C. Pro další použití byly tyto misky uzavřené parafilmem uchovávány v chladničce.

### 4.2 Testování exprese

Pro další testování byly vybrány dva kmeny *E. coli*, BL21(DE3)GOLD a BL21(DE3)pLysS. Do šesti sterilních zkumavek byly napipetovány 2 ml LB média obsahujícího stejná antibiotika o stejných koncentracích jako v případě transformace (kap. 4.1). Sterilním párátkem byly do tří zkumavek s LB médiem vloženy tři kolonie bakterií kmene GOLD, které byly vypěstovány na misce s LB agarem. To stejné bylo provedeno s bakteriálním kmenem pLysS. Zkušavky byly následně uzavřeny a ponechány třepat přes noc při 37 °C a 220 ot./min. Druhý den bylo připraveno 12 sterilních zkumavek, do kterých bylo přidáno 1 ml LB média a 10 µl z nočních stacionárních kultur. Z každé noční kultury bylo



přeneseno 10  $\mu$ l do dvou zkumavek s čerstvým LB médiem. Všechny zkumavky byly uzavřeny a třepány při 37 °C a 220 ot./min po dobu dvou hodin. Po této době byly do zkumavek označených jako (+) přidány 3  $\mu$ l 100mM roztoku IPTG, jako induktoru, do celkové koncentrace 0,3 mM. Všechny zkumavky byly následně třepány při 37 °C a 220 ot./min po dobu tří hodin. Po třepání byly kultury přeneseny do mikrozkušavek a centrifugovány po dobu 3 minut při 16 000 $\times$ g za laboratorní teploty. Poté byl odebrán supernatant a bakterie byly resuspendovány ve 160  $\mu$ l 1x vzorkového pufru redukujícího pro analýzu SDS-PAGE. Vzorky byly 5 minut sonikovány a povařeny 10 minut na vroucí vodní lázni. Následně byly centrifugovány při 16 000 $\times$ g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a analyzovány pomocí metody SDS-PAGE.

### **4.3 SDS- PAGE**

SDS elektroforéza byla provedena v 17,5% polyakrylamidovém gelu. Složení dělicího a zaostřovacího gelu je uvedeno v tab. 1 a tab. 2. Nejprve byla připravena aparatura pro nalití gelů. Mezi skla byl nalit separační gel a převrstven destilovanou vodou. Po ztuhnutí gelu byla voda odstraněna a skla jemně osušena filtračním papírem. Na separační gel byl nalit zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřeben. Po vytvoření viditelného rozhraní mezi hřebenem a zaostřovacím gelem byl hřeben vyndán a skla s gely vložena do aparatury pro elektroforézu a převrstvena elektrodovým pufrem. Následně byly nanесeny vzorky (dle kap. 4.2) a standard molekulových hmotností do první a poslední dráhy. Do prvního gelu bylo nanášeno 5  $\mu$ l vzorků a stejné množství standardu, do druhého po 10  $\mu$ l. Poté byla aparatura uzavřena a elektroforéza probíhala přibližně 90 minut při napětí 200 V a proudu 52 mA. Gel s menší nanáškou vzorku byl poté umístěn na třepačku do barvicího roztoku pro SDS-PAGE po dobu 30 minut. Následně byl odbarvován třikrát po dobu 10 minut v odbarvovacím roztoku pro SDS elektroforézu. Druhý gel byl dále použit pro elektropřenos proteinu na PVDF membránu. Proto byl mezitím uložen do pufru pro elektropřenos.

Tab. 1: Složení 17,5% separačního gelu

(množství pro 2 gely,  $V \approx 10$  ml)

Látka	$V / ml$
d H <sub>2</sub> O	1,5
30 % Akrylamidová směs	5,8
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10 % SDS	0,1
10 % APS	0,1
TEMED	0,004

Tab. 2: Složení 5% zaostřovacího gelu

(množství pro 2 gely,  $V \approx 2$  ml)

Látka	$V / ml$
d H <sub>2</sub> O	1,4
30 % Akrylamidová směs	0,33
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,25
10 % SDS	0,02
10 % APS	0,02
TEMED	0,002

#### 4.4 Elektropřenos na membránu

Produkováný protein byl identifikován pomocí N-koncového Edmanova odbourávání a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie analýzou tryptických štěpů.

Pro Edmanovo odbourávání byl protein přenesen z gelu na PVDF membránu elektropřenosem. Do aparatury pro elektropřenos byla vložena maska s výřezem, do kterého bylo naskládáno 6 filtračních papírů namočených v pufru pro elektropřenos. Na ně byla položena vystřižená PVDF membrána o rozměrech 5 x 7,5 cm nejprve inkubovaná v methanolu a později v pufru pro elektropřenos. Na membránu bylo následně vloženo dalších 6 filtračních papírů namočených v pufru pro elektropřenos. Přístroj byl uzavřen a zahájen elektropřenos na 45 minut při napětí 10 V a proudu 50 mA. Po ukončení elektropřenosu byla membrána promyta malým množstvím destilované vody. Gel použitý k elektropřenosu byl barven stejně jako gel uvedený výše (v kap. 4.3) barvicím roztokem pro SDS-PAGE ale pouze po dobu 5 minut. Membrána byla barvena barvicím roztokem pro SDS-PAGE a po chvíli odbarvena odbarvovacím roztokem pro PVDF membrány. Následně byla membrána opět omyta destilovanou vodou a předána k sekvenaci Prof. Karlu Bezouškovi.

Přípravu vzorků pro MALDI-TOF MS i vlastní měření hmotnostní spektrometrií provedl RNDr. Hynek Mrázek, Ph.D.

## 4.5 Optimalizace produkce proteinu

Pro optimalizaci proteinové exprese byl použit pouze kmen *E. coli* BL21(DE3)GOLD. Při tomto experimentu se zjišťoval vliv produkční teploty a koncentrace induktoru IPTG na produkci proteinu. Do 12 zkumavek byl napipetován 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky a 50  $\mu$ l bakteriální kultury, která byla připravena z uložených transformovaných bakterií.

Zkumavky byly ponechány na třepačce po dobu tří hodin, při 220 ot./min, v místnosti o teplotě 37 °C. Následně byl do prvních 6 zkumavek přidán induktor (IPTG) do výsledné koncentrace 0 mM; 0,001 mM; 0,03 mM; 0,1 mM; 0,3 mM a 1 mM. Tyto zkumavky byly ponechány třepat další 3 hodiny v místnosti o 37 °C. Zbylé zkumavky byly přeneseny do místnosti vyhřívané na 28 °C a ponechány vytemperovat 30 minut na tuto teplotu. Následně byly indukovány induktorem IPTG do stejných koncentrací jako je uvedeno výše v této kapitole. Vzorky byly inkubovány přes noc.

Vzorky z optimalizace byly vyhodnocovány pomocí metody SDS-PAGE. Vzhledem k velikosti exprimovaného proteinu byl použit 19% rozdělovací polyakrylamidový gel. Jeho složení je uvedeno v tab. č. 3. Byl připraven jeden tento gel.

Tab. 3: Složení 19% dělicího gelu

(množství pro 2 gely,  $V \approx 10$  ml)

Látka	$V / ml$
d H <sub>2</sub> O	1,2
30 % Akrylamidová směs	6,1
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10 % SDS	0,1
10 % APS	0,1
TEMED	0,004

## 4.6 Velkoobjemová produkce

Velkoobjemová produkce byla provedena ve dvou 2 l Erlenmeyerových baňkách obsahujících 500 ml LB média s příslušnými antibiotiky. Do každého bylo zaočkováno

500 µl bakteriální kultury, která byla uchovávána v chladničce. Obě baňky s kulturami byly inkubovány 4,5 hodiny při 220 ot./min a 37 °C. Nárůst buněčné kultury byl kontrolován měřením absorpance při 550 nm. Při dosažení hodnot absorpance 0,5-0,6 při 550 nm byl přidán induktor (IPTG) do výsledné koncentrace 0,01 mM. Následně byly baňky inkubovány další 3 hodiny při 220 ot./min a 37 °C. Tyto parametry koncentrace induktoru a teploty byly zjištěny v kap. 4.5.

Po ukončení inkubace byly kultury sklizeny a rozděleny mezi čtyři kyvety. Tyto kyvety s kulturami byly vyváženy a centrifugovány 15 minut při 10 000×g. Supernatant byl odstraněn a kyvety s peletami byly zmrazeny na - 80 °C.

## **4.7 Izolace inkluzních tělísek**

K izolaci inkluzních tělísek byly použity dvě kyvety se zmraženými bakteriálními peletami získanými při velkoobjemové produkci, viz. kap. 4.6. Vzorky byly rozmrazeny v kádince se studenou vodou. Do jedné kyvety bylo přidáno 30 ml sacharóзовého lyzačního pufru a vzorek byl resuspendován. Obsah byl přelit do druhé kyvety a opět resuspendován. Vzorek byl pro lepší manipulaci přelit do menší 50 ml kyvety. Do roztoku byl přidán 1 µl 10mM leupeptinu a pepstatinu, 10 µl RNasy a DNasy o koncentraci 10 mg/ml, a 30 µl 1M MgCl<sub>2</sub> do 10 mM koncentrace. Vzorek byl 6x po dobu 30 s sonikován a mezi jednotlivými sonikacemi 30 s inkubován na ledu. Poté byla kyveta s roztokem zmrazena na - 80 °C. Celý postup (sonikace a mražení) byl opakován celkem třikrát. Po poslední sonikaci následovala centrifugace 15 minut při 4 °C a 8 000×g. Ze supernatantu bylo odebráno 20 µl vzorku pro pozdější SDS-PAGE analýzu. Poté byl supernatant odlit.

Peleta byla resuspendována ve 30 ml pufru s detergentem. Do roztoku bylo následně přidáno 30 µl 1M MgCl<sub>2</sub> a inhibitory proteáz (leupeptin, pepstatin, DNAsa, RNAsa) ve stejném množství jako je uvedeno výše spolu se 100 µl 100mM PMSF. Roztok byl sonikován a inkubován 30 s na ledu. Sonikace a inkubace se opakovaly třikrát. Poté byl roztok centrifugován za stejných podmínek, jako je uvedeno výše. Ze supernatantu bylo odebráno 20 µl vzorku pro následnou SDS-PAGE analýzu a poté byl supernatant odlit.

Usazenina byla resuspendována ve 30 ml pufru bez detergentu. Sonikace a inkubace na ledu se prováděla po dobu 30 s. Sonikace a inkubace se opakovaly třikrát. Bylo odebráno 20 µl vzorku k analýze SDS-PAGE. Nakonec byl roztok centrifugován za stejných

podmínek, jako je uvedeno výše. Ze supernatantu bylo opět odebráno 20  $\mu$ l vzorku. Supernatant byl odlit a usazenina zmražena na - 80 °C.

Se čtyřmi odebranými vzorky byla provedena SDS-PAGE. 19% polyakrylamidový dělicí gel byl připraven podle postupu z kap. 4.3 a složení z kap. 4.5. Příprava vzorků se odlišovala. K 100  $\mu$ l roztoku inkluzních tělísek bylo přidáno 140  $\mu$ l 1x vzorkového pufru redukujícího. Do tří 20  $\mu$ l vzorků bylo napipetováno 20  $\mu$ l 2x vzorkového pufru redukujícího.

## 4.8 Renaturace proteinu

Zmražená inkluzní tělíska byla rozpuštěna v 5 ml 8 M močoviny v 50 mM Tris-HCl. Močovina zde slouží jako chaotropní činidlo. Do resuspendovaných inkluzních tělísek bylo přidáno 50  $\mu$ l 1M DTT do 10 mM koncentrace. Tato květa s inkluzními tělísky byla centrifugována 15 minut při 33 000 $\times$ g.

Protein byl renaturován metodou rychlého naředění. 500 ml připraveného renaturačního pufru bylo vytemperováno na 4 °C. Supernatant získaný centrifugací se přikapával do míchaného renaturačního pufru v chlazené místnosti rychlostí přibližně 1 kapka za 3 vteřiny. Pufr s inkluzními tělísky byl ponechán za stálého míchání v chlazené místnosti po dobu 48 hodin.

Renaturační roztok byl zakoncentrován na objem cca 30 ml pomocí ultrafiltrační aparatury, která byla připojena k tlakové láhvi s N<sub>2</sub>, tlak na láhvi nastaven na 0,3 MPa. K ultrafiltraci byla použita celulosová membrána s limitem propustnosti (MWCO) 10 kDa. Ultrafiltrace probíhala přibližně 3 hodiny. Tento objem byl rozdělen po 15 ml do dvou koncentrátorů a zakoncentrován na 300  $\mu$ l pomocí centrifugačního koncentrátoru při 1 700 $\times$ g za 1 hodinu. Z proteinových roztoků byly precipitované agregáty odstraněny centrifugací 5 minut, 16 000 $\times$ g. Vzorky byly uloženy do chladničky při 4 °C.

## 4.9 Gelová chromatografie na Superdexu 75

Před vlastní purifikací byly roztoky centrifugovány po dobu 5 minut při 16 000 $\times$ g. Supernatant byl přepipetován do čistých mikrozkupek. Gelová chromatografie probíhala na koloně Superdex 75 10/300 GL na purifikačním systému BioSys 510. Před vlastním nanesením vzorku byla kolona promývána 45 minut pomocí pufru pro gelovou

chromatografii (mobilní fázi). Byl nastaven průtok kolonou 0,4 ml/min a sledování absorbance při 280 nm.

Obě zkumavky, dohromady s 600  $\mu$ l roztoku, byly použity k vlastní gelové chromatografii. Objem 600  $\mu$ l byl nanesen na kolonu a od 18 minuty byly jímány jednotlivé frakce.

S jednotlivými frakcemi byla provedena SDS-PAGE. Vzorky pro elektroforézu byly připraveny jak v redukujícím tak i v neredukujícím prostředí. Z každého vzorku bylo odebráno 2 $\times$  7,5  $\mu$ l a pro neredukující prostředí bylo přidáno 7,5  $\mu$ l 2 $\times$  vzorkového pufru neredukujícího. Pro redukující prostředí bylo přidáno 7,5  $\mu$ l 2 $\times$  vzorkového pufru redukujícího. Vzorky byly povařeny 5 minut a centrifugovány 5 minut při 16 000 $\times$ g. Každého vzorku se na gel nanášelo 10  $\mu$ l vzorku.

Tab. 4: Složení 15% dělicího gelu

(množství pro 3 gely,  $V \approx 15$  ml)

Látka	$V / ml$
d H <sub>2</sub> O	3,4
30 % Akrylamidová směs	7,5
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8
10 % SDS	0,15
10 % APS	0,15
TEMED	0,006

#### 4.10 Stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové

Nejprve byly připraveny kalibrační roztoky BSA. Zásobní roztok BSA měl koncentraci 10 mg/ml. Z něj byly připraveny jednotlivé kalibrační roztoky o koncentracích 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml.

Do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno třikrát po 5  $\mu$ l od každého standardního roztoku a navíc třikrát po 5  $\mu$ l destilované vody jako slepý vzorek. Ke všem vzorkům z gelové chromatografie bylo přidáno 200  $\mu$ l činidla pro stanovení dle Bradfordové obsahujícího Coomassie Brilliant Blue G-250. Ty nejkoncentrovanější (6, 7, 8)

byly pětkrát naředěny. Všechny vzorky byly centrifugovány 5 minut při 16 000×g a ponechány 10 minut při laboratorní teplotě.

Poté byla proměřena absorbance při 595 nm pomocí monochromátorové čtečky destiček Safire2. Z naměřených absorbancí standardů byla sestrojena kalibrační přímka, ze které byly podle naměřených absorbancí vypočítány koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích.

## 5. VÝSLEDKY

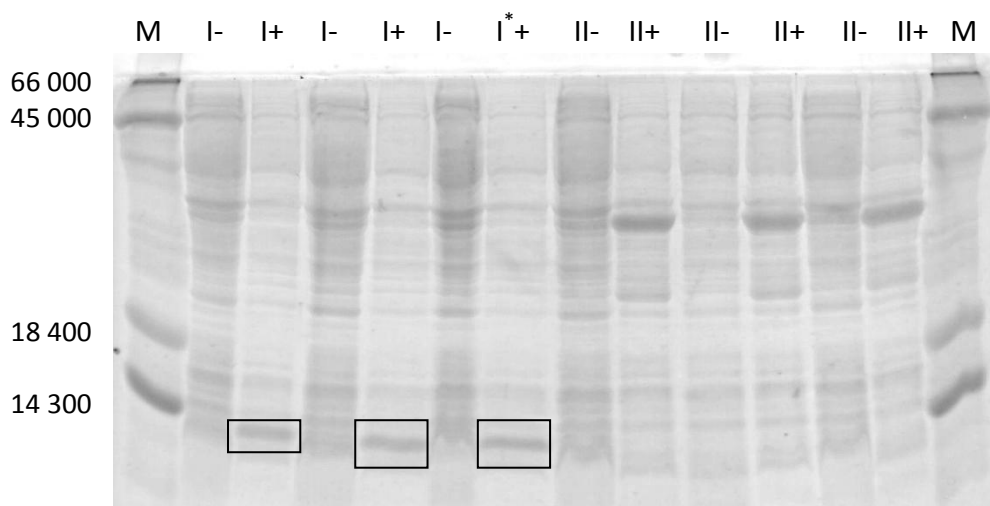
### 5.1 Bakteriální transformace

Prvním krokem rekombinantní exprese byla transformace kompetentních buněk *E. Coli* kmenů BL21(DE3)GOLD, BL21(DE3)RIPL a BL21(DE3)pLysS plazmidem pNKp30. Na LB agaru obsahujícím bakteriální kmen BL21(DE3)pLysS vyrostlo velké množství bakteriálních kolonií, kolem 2500. Na LB agaru obsahujícím kmen bakterií BL21(DE3)GOLD vyrostlo cca 100 bakteriálních kolonií. Na LB agaru obsahujícím kmen bakterií BL21(DE3)RIPL vyrostlo velmi málo bakteriálních kolonií, v řádu jednotek, proto byl tento bakteriální kmen vyloučen z dalších pokusů. Na kontrolním LB agaru s bakteriálním kmenem BL21(DE3)RIPL nevyrostly žádné bakteriální kolonie, protože v buňkách nebyl obsažen výše uvedený plazmid. Proto tedy neměly rezistenci na antibiotikum, kanamycin, obsažený v LB agaru.

### 5.2 Testování exprese

Dalším krokem byl výběr produkčního klonu popsany v kapitole 4.2. K 1 ml LB média bylo přidáno 10  $\mu$ l z nočních stacionárních kultur. Zkumavky se směsí byly inkubovány 2 hodiny při 220 ot./min a 37 °C. Po uplynutí této doby byly do zkumavek označených jako (+) přidány 3  $\mu$ l 100 mM roztoku induktoru IPTG. Všechny zkumavky byly následně třepány 3 hodiny při 220 ot./min a 37 °C. Roztok IPTG v (+) zkumavkách indukoval expresi NKp30. Ve zkumavkách s kulturami označenými (-) nebyl induktor přidán, a proto se zde exprese proteinu neprojevila. Tyto vzorky byly následně vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE v redukujícím prostředí (obr. 5, str. 33).





**Obr. 5: Selektce produkčního klonu.** Dráha označená jako M představuje standard molekulových hmotností. Dráhy označené (+) zastupují vzorky obsahující IPTG, dráhy označené (-) zastupují vzorky bez IPTG. Vzorky označené I představují produkční kmen GOLD a vzorky označené II představují produkční kmen pLysS. Dráha označená \* představuje klon, který nejvíce obsahuje požadovaný protein.

Jako optimální produkční klon byl vybrán kmen GOLD označený hvězdičkou (\*), který produkoval nejvíce požadovaného proteinu.

### 5.3 Identifikace produkovaného proteinu

Produkovaný protein byl identifikován pomocí MALDI-TOF MS analýzou tryptických štěpů a dále pomocí Edmanova odbourávání. Obě tyto metody jsou popsány v kapitole 4.4.

Přípravu vzorku na MALDI-TOF MS analýzu tryptických štěpů (z dráhy I+ označené hvězdičkou) a vlastní analýzu provedl RNDr. Hynek Mrázek, Ph.D. Naměřené hodnoty potvrdily, že analyzovaný protein odpovídá proteinu NKp30 (pokrytí sekvence 83 % viditelné na obr. 6, str. 32). Hmotnostní spektrum je zobrazeno na obr. 7, str. 34, a jednotlivé peptidy jsou vypsány v tab. 5, str. 34.

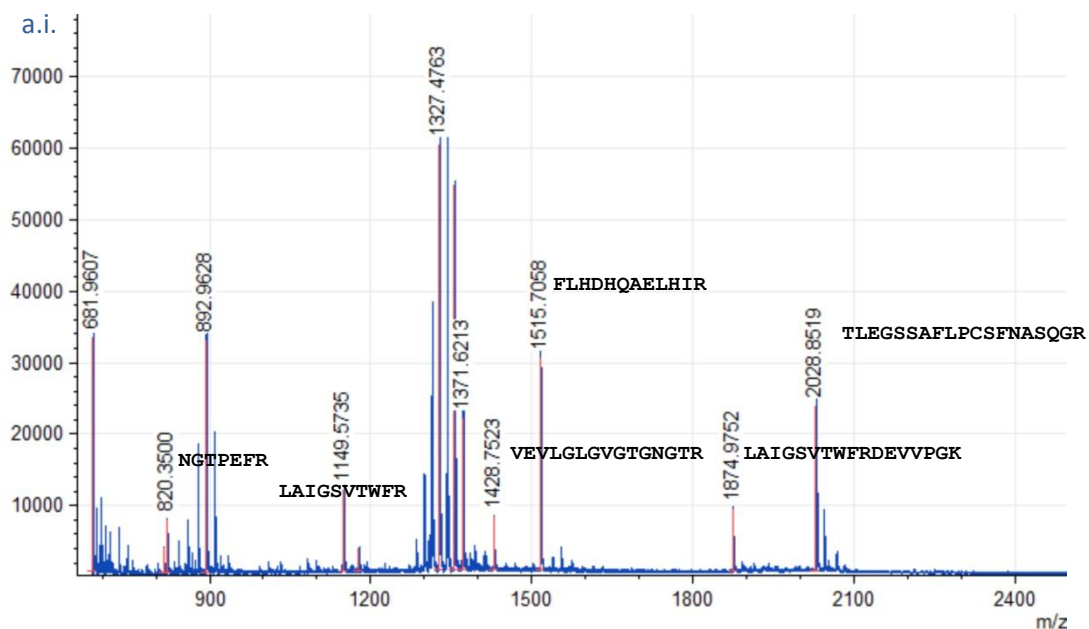
Edmanovým odbouráváním bylo potvrzeno prvních 7 aminokyselin od N-konce proteinu. Protein byl přenesen elektropřenosem z druhého polyakrylamidového gelu po SDS-PAGE na PVDF membránu. PVDF membrána k sekvenaci byla předána Prof. Karlu Bezouškovi. Získaná sekvence MLWVSTP, u které může být threonin nahrazen glutaminem, potvrdila, že se jedná o NKp30.

1 MLWVSQPPEI RTLEGSSAFL PCSFNASQGR LAIGSVTWFR DEVVPGK<sup>EVR</sup>

51 NGTPEFR<sup>GRL</sup> APLASSRFLH DHQAE<sup>LHIR</sup>D VRGHDASIYV CRVEVLGLGV

101 GTGNGTR<sup>LVV</sup> EKEHPQLG

Obr. 6: Pokrytí sekvence. Červeně jsou označeny potvrzené peptidy.



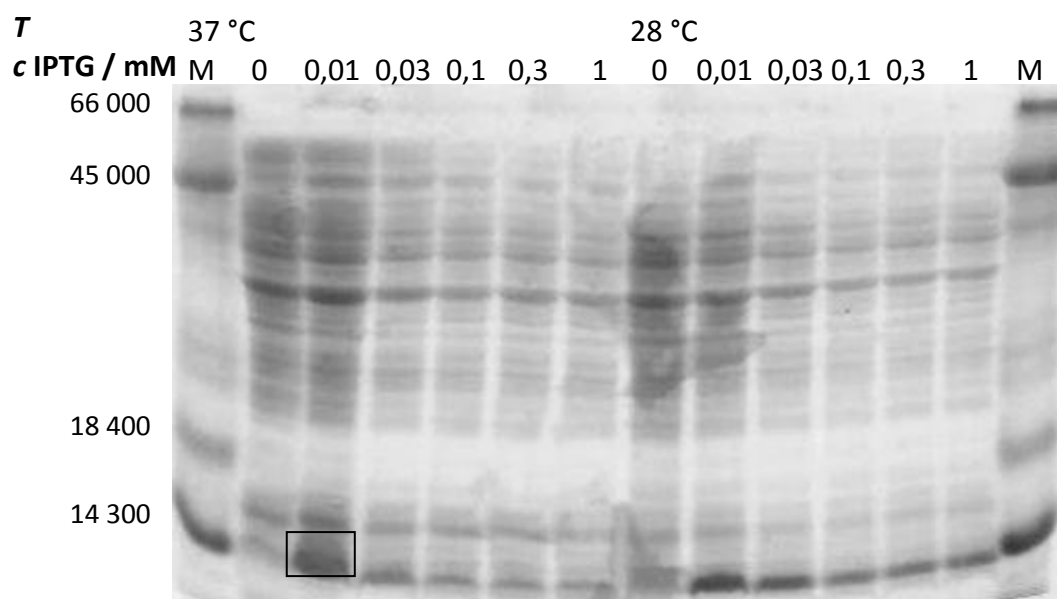
Obr. 7: Hmotnostní spektrum proteinu analyzovaného MALDI-TOF MS analýzou tryptických štěpů. Vyznačeno několik peptidů.

Tab. 5: Jednotlivé peptidy odpovídající hmotnostnímu spektru.

Počátek a konec peptidu	$m/z$	Sekvence peptidu
1 – 11	1355,6067	MLWVSQPPEIR
12 – 30	2028,8947	TLEGSSAFLPCSFNASQGR
31 – 40	1149,6346	LAIGSVTWFR
31 – 47	1874,0022	LAIGSVTWFRDEVVPGK
51 – 57	820,3785	NGTPEFR
51 – 57	821,3266	NGTPEFR
60 – 67	814,4680	LAPLASSR
68 – 79	1515,7687	FLHDHQAELHIR
83 – 92	1177,5475	GHDASIYVCR
93 – 107	1428,7799	VEVLGLGVGTGNGTR

## 5.4 Optimalizace produkce proteinu

Po identifikaci proteinu následovala optimalizace produkce NKp30. K optimalizaci byly vybrány dva parametry: koncentrace induktoru IPTG a teplota. Vlastní optimalizace těchto dvou parametrů byla důležitá pro nalezení nejlepšího producenta vhodného pro velkoobjemovou produkci. Vyhodnocení proběhlo pomocí SDS-PAGE (Obr. 8, str. 35).



Obr. 8: Optimalizace koncentrace IPTG a teploty při produkci proteinu.

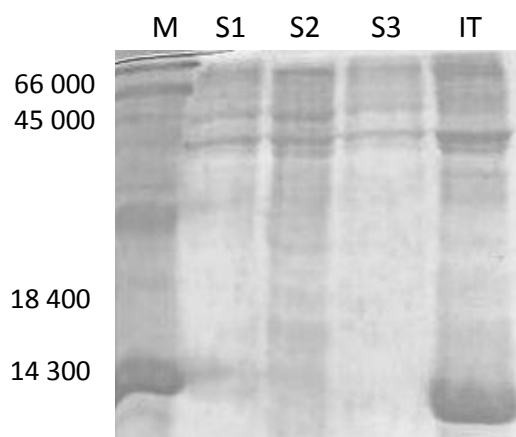
Optimální koncentrace IPTG pro produkci proteinu je 0,01 mM. Z uvedených výsledků je zřejmé, že vyhovovala tato nejnižší koncentrace induktoru IPTG pro produkci proteinu.

Jako optimální byla vyhodnocena teplota 37 °C, při této teplotě byla produkce proteinu vyšší.

## 5.5 Velkoobjemová produkce a izolace inkluzních tělísek

Nalezené optimalizované podmínky byly využity při velkoobjemové produkci podle kapitoly 4.6. Následně bylo postupováno podle kapitoly 4.7. NKp30 byl produkován ve dvou Erlenmeyerových baňkách obsahujících 500 ml LB media s antibiotiky tetracyklinem a kanamycinem. Nejprve byly buněčné kultury inkubovány 4,5 hodiny při 220 ot./min a 37 °C do optické denzity 0,5-0,6. Po přidavku induktoru IPTG do koncentrace 0,01 mM byl protein produkován po dobu 3 hodin při 37 °C.

Následovala izolace inkluzních tělísek, což jsou nerozpustné útvary obsahující proteiny v bakteriální cytoplazmě. Pomocí sacharósového lyzačního pufru spolu se sonikací a mražením došlo k rozbití buněk, které bylo dále zintenzivněno promýváním sedimentu v pufru s detergentem. Následně pufr bez detergentu již pouze detergent vymýval. Účinnost izolace inkluzních tělísek byla sledována pomocí SDS-PAGE v redukujícím prostředí (obr. 9, str. 36).



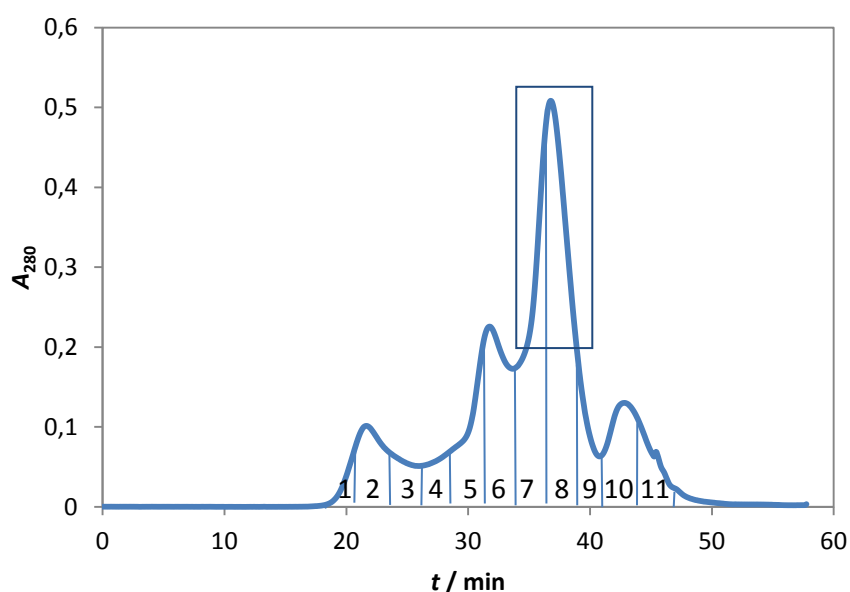
**Obr. 9: Postup izolace inkluzních tělísek.** Dráha označená M značí standard molekulových hmotností, dráhy S1-3 označují supernatanty v jednotlivých krocích izolace a dráha IT sediment inkluzních tělísek.

Z kontrolní SDS-PAGE bylo jasné, že izolace inkluzních tělísek proběhla úspěšně, produkováný protein byl nalezen pouze v sedimentu inkluzních tělísek. Nedocházelo k vymývání inkluzních tělísek.

## 5.6 Renaturace proteinu a gelová chromatografie na Superdexu 75

Po izolaci inkluzních tělísek následovala renaturace proteinu popsaná v kap. 4.8. Sediment inkluzních tělísek byl rozpuštěn v 8 M močovíně a 50 mM Tris-HCl. K tomuto roztoku bylo přidáno DTT do 10 mM koncentrace. Následovala centrifugace 15 minut při 33 000×g. Renaturace proteinu proběhla metodou rychlého naředění, což znamenalo, že supernatant po centrifugaci byl přikapáván do renaturačního pufru přibližnou rychlostí 1 kapka za 3 vteřiny. Následovala inkubace v chlazené místnosti po dobu 48 hodin. Poté byl renaturační roztok zakonzentrován ultrafiltrací na objem cca 30 ml a dále zakonzentrován centrifugačními koncentrátoři na 600 µl při 1 700×g.

Purifikace proteinu byla provedena gelovou chromatografií na Superdexu 75 10/300 GL na purifikačním systému BioSys 510 podle kapitoly 4.9. Eluční profil produkovaného proteinu zobrazuje obr. 10. Byl nastaven průtok kolonou na 0,4 ml/min. Jednotlivé jímané frakce, vypsané v tab. 6, byly vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí (obr. 11, str. 37).

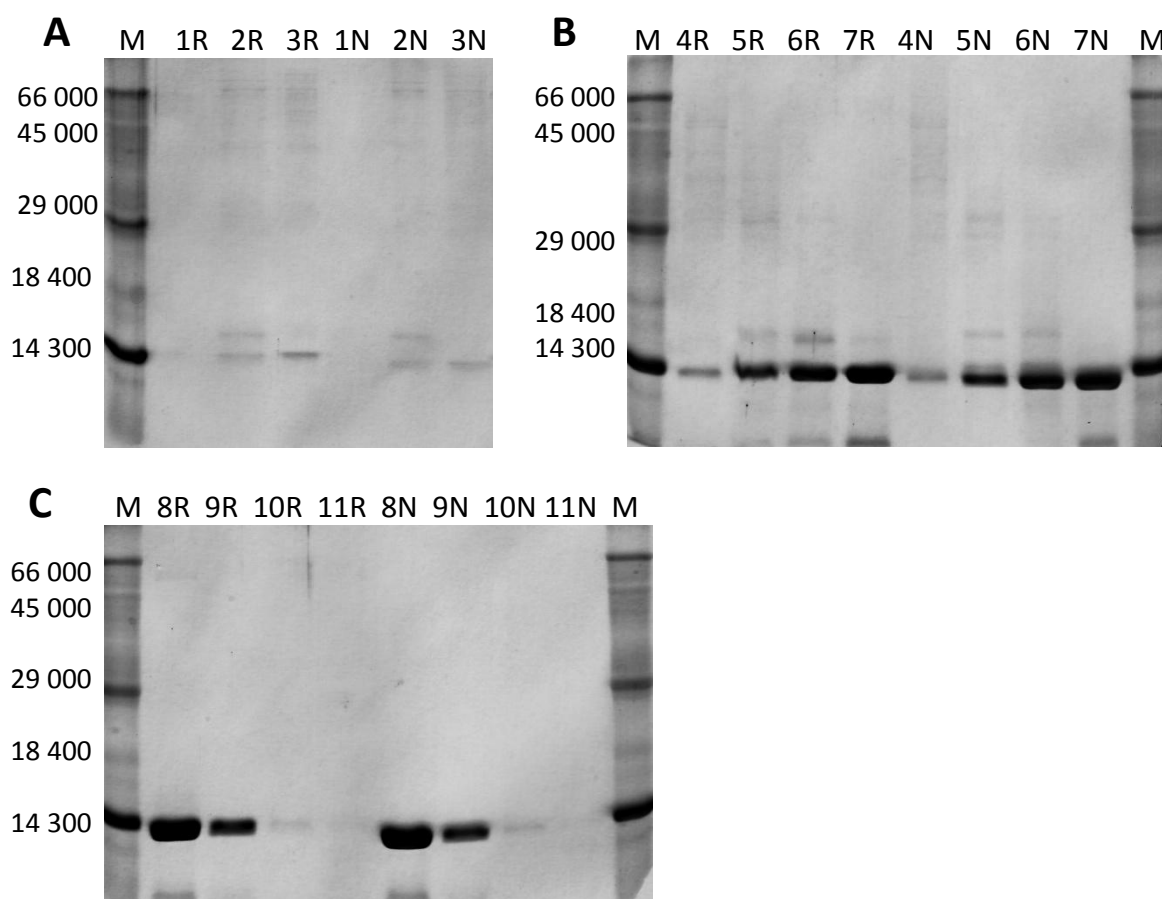


**Obr. 10:** Eluční profil proteinu NKp30 získaný gelovou chromatografií na Superdexu 75.

Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. První chromatografický vrchol označuje agregáty proteinu, druhý chromatografický vrchol pravděpodobně dimery proteinu a třetí chromatografický vrchol je vlastní protein NKp30. Čarami jsou naznačeny sbírané frakce.

**Tab. 6:** Jímané frakce při gelové chromatografii. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Frakce byly jímány po cca 1 ml.

Frakce	<i>t</i> / min	Frakce	<i>t</i> / min
1	18,5	7	34
2	21	8	36,5
3	23,8	9	39
4	26,3	10	41
5	28,7	11	44
6	31,5		

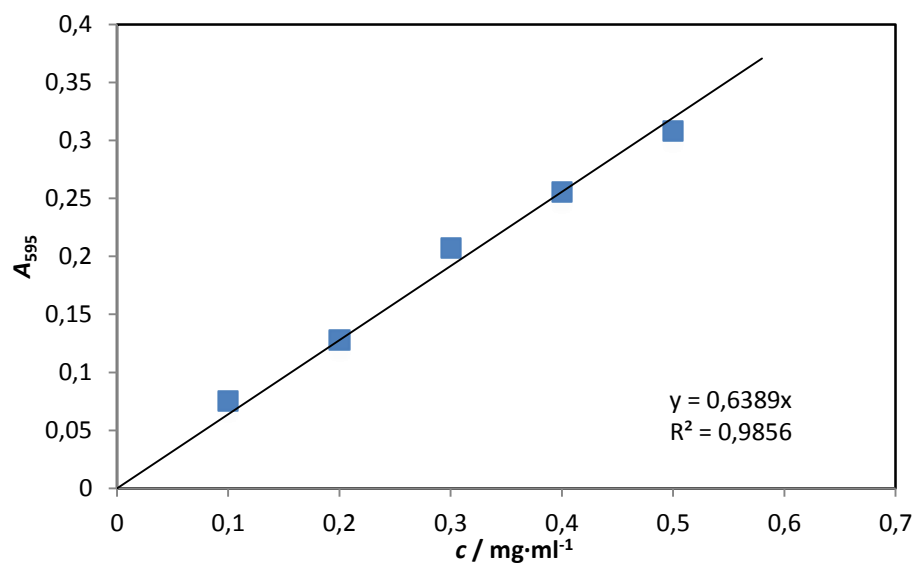


**Obr. 11: SDS-PAGE po gelové chromatografii na Superdexu 75.** Jednotlivá čísla označují frakce, které jsou vypsány v tab. 6. Písmena N a R označují frakce v neredukujícím a redukujícím vzorkovém pufru.

Z výsledků SDS elektroforézy je patrné, že se podařilo protein NKp30 vyprodukovat v relativní čistotě. Použitím neredukujícího vzorkového pufru je viditelný určitý posun zón, který naznačuje vytvoření disulfidového můstku a tedy i složení molekuly. Z gelů je však patrné, že se i v nižších molekulových hmotnostech, než je sám protein, objevily nečistoty.

## 5.7 Stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové

Bylo postupováno podle kap. 4.10. Z jednotlivých frakcí získaných gelovou chromatografií bylo napipetováno 5  $\mu$ l na mikrotitrační destičku a přidáno 200  $\mu$ l činidla pro stanovení podle Bradfordové. Byla změřena absorbance při 595 nm. Ze standardů BSA byla vytvořena kalibrační přímka (obr. 12, str. 39). Pomocí rovnice kalibrační přímky byly nalezeny koncentrace jednotlivých frakcí produkovaného proteinu, zejména frakce 7 a 8, které obsahují vysoké množství našeho proteinu. Vypočítané koncentrace frakcí 7 a 8 jsou uvedeny v tab. 7, str. 39.



Obr. 12: Kalibrační přímka standardů BSA.

Tab. 7: Vypočítané koncentrace frakcí proteinu a výtěžek proteinu. Tyto frakce byly pětkrát ředěné

Frakce	$t$ / min	$c$ / $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	$V$ / ml	Množství proteinu / mg	
7	34,0	3,3	1	3,3	7,3
8	36,5	4,0	1	4,0	

Při velkoobjemové produkci byl použit 1 l LB média pro produkci proteinu NKp30. Následně byla inkluzní tělíska izolována pouze z 0,5 l média. Proto po renaturaci a purifikaci proteinu bylo stanoveno množství proteinu, 7,3 mg, z 0,5 l LB média. Při gelové chromatografii byl použit pouze jeden nástřik celého získaného zakonzentrovaného roztoku proteinu o množství 600  $\mu\text{l}$ . Celkové množství proteinu z 1 l LB média by bylo tedy přibližně 14,6 mg.

## 6. DISKUZE

Cílem bylo vyprodukovat NKp30 a to pomocí metody transformace bakteriální buňky expresním plazmidem pNKp30, najít vhodný produkční kmen, optimalizovat expresi a naprodukovat protein ve velkém množství prokaryotického expresního systému. Následně protein *in vitro* renaturovat, purifikovat a určit množství exprimovaného proteinu z 1 l LB média.

Prvním krokem byla transformace kompetentních buněk *E. coli* kmenů BL21(DE3)GOLD, BL21(DE3)RIPL a BL21(DE3)pLysS. Pro transformaci byl použit plazmid pNKp30 připravený firmou Generay Biotech Co., Ltd.. Poté bylo provedeno testování exprese s bakteriálními kmeny *E. coli* BL21(DE3)GOLD a BL21(DE3)pLysS. Jako produkční kmen *E. coli* byl vybrán BL21(DE3)GOLD. Zřejmě lepší by bylo připravit si negativní kontrolu ode všech kmenů *E. coli* než pouze od kmene BL21(DE3)RIPL, který se pro transformaci nejevil jako nejvhodnější díky malému počtu narostlých kolonií na LB agaru. Malé množství narostlých kolonií mohlo být způsobeno například stářím zásobního kmene BL21(DE3)RIPL. Následovala identifikace exprimovaného proteinu Edmanovým odbouráváním prvních 7 aminokyselin od N-konce proteinu a MALDI-TOF MS analýzou tryptických štěpů. Edmanovým odbouráváním byla identifikována sekvence MLWVSTP, u které může být na šesté pozici místo threoninu eventuálně glutamin. Šestá aminokyselina nemohla být jednoznačně určena, zda se jednalo o threonin nebo glutamin. Hmotnostní spektrometrií bylo stanoveno pokrytí sekvence z 83 %. Na základě tohoto bylo potvrzeno, že se jednalo skutečně o NKp30. N-konec se nám podařil potvrdit oběma metodami, ale C-konec bohužel ani jednou metodou. Následovala optimalizace produkce proteinu, kdy byly nalezeny optimální podmínky pro velkoobjemovou produkci proteinu. Jako optimální byla stanovena teplota 37 °C a optimální koncentrace induktoru IPTG 0,01 mM. Nižší koncentrace induktoru IPTG jsou vhodnější, protože ve větších množstvích působí IPTG na bakterie inhibičně. Dále byl protein produkován ve dvou Erlenmeyerových baňkách obsahujících po 0,5 l LB média za optimalizovaných podmínek. Následovala izolace inkluzních tělísek, která proběhla úspěšně, jelikož nedošlo k vymývání inkluzních tělísek použitými pufrů. Poté proběhla renaturace proteinu metodou rychlého naředění v renaturačním pufru. Následně byla provedena purifikace proteinu gelovou chromatografií na koloně Superdex 75 10/300 GL. Z jednotlivých frakcí byly připraveny



vzorky v redukujícím a neredukujícím vzorkovém pufru pro SDS-PAGE. Jak je vidět z gelů, v linii vyšších molekulových hmotností ve dřívějších frakcích a v linii malých molekulových hmotností v pozdějších frakcích byly nalezeny další proteiny. U nečistot v pozdějších frakcích předpokládáme, že buď došlo k rozpadnutí proteinu v průběhu vaření vzorků ve vzorkovém pufru na gelovou elektroforézu, nebo jsou to jiné proteiny. Pro větší čistotu připravovaného proteinu by se mohla před gelovou chromatografií zařadit i ionexová chromatografie. Dalo by se i zaměřit na tyto nečistoty a identifikovat je například hmotnostní spektrometrií za pomoci matrice nebo celou frakci identifikovat hmotnostní spektrometrií s Fourierovskou transformací. Nakonec bylo provedeno stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové. Ze získané kalibrační křivky standardních roztoků BSA byla vypočítána koncentrace proteinu ve dvou jímaných frakcích (frakce 7,8). Příprava proteinu probíhala pouze z 0,5 l LB média. Výtěžek z 1 l LB média bychom proto odhadli přibližně na 14,6 mg proteinu.

## 7. ZÁVĚR

- byly transformovány kompetentní buňky expresním plazmidem pNKp30 a byl vybrán vhodný produkční klon
- byly optimalizovány parametry (koncentrace induktoru IPTG a teploty produkce) pro velkoobjemovou produkci NKp30 v LB médiu
- bylo získáno 7,3 mg proteinu z 0,5 l LB média, výtěžek proteinu z 1 l LB média lze tedy přibližně odhadnout na 14,6 mg
- získaný preparát může posloužit k detailnímu výzkumu struktury tohoto receptoru nebo ke studiu interakce s jeho ligandy

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Burmester G., Pezzutto, A.: Color Atlas of Immunology. Thieme, New York (2003)
- [2] Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie. 4. vydání Triton, Praha (2009)
- [3] Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S.: Cellular and Molecular Immunology. 7. vydání Elsevier, Philadelphia (2007)
- [4] Trinchieri, G.: Adv. Immunol. 47, 187-376 (1989)
- [5] Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: Eur. J. Immunol. 5, 112-117 (1975)
- [6] Pross, H., Jondal, M.: Clin. exp. Immunol. 21, 226-235 (1975)
- [7] Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S.: Nat. Immunol 9, 503 - 510 (2008)
- [8] Moretta, L., Moretta, A.: EMBO J. 23, 255-259 (2004)
- [9] Zhang, Y., et al.: Immunology 121, 258-265 (2007)
- [10] Převzato z Cancer Research Institute of West Tennessee, dostupné na [www.cancerfoundation.com/NKcells.html](http://www.cancerfoundation.com/NKcells.html) (poslední přístup dne 5. 5. 2013)
- [11] Zhang, C., Zhang, J., Tian, Z.: Cell. Mol. Immunol. 3, 241-254 (2006)
- [12] Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Coutsens, L. P., Salazar-Mather, T. P.: Annu. Rev. Immunol. 17, 189-220 (1999)
- [13] Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A.: Trends Immunol. 22, 633-640 (2001)
- [14] Raulet, D. H., Vance, R. E.: Nat. Rev. Immunol. 6, 520-531 (2006)
- [15] Lodoen, M. B., Lanier, L. L.: Nat. Rev. Microbiol. 3, 59-69 (2005)
- [16] Ravetch, J. V., Bolland, S.: Annu. Rev. Immunol 19, 275-290 (2001)
- [17] Yokoyama, W. M., Plougastel, F. M.: Nat. Rev. Immunol. 3, 304-316 (2003)
- [18] Lanier, L. L.: Nat. Immunol. 9, 495-502 (2008)
- [19] Vivier, E., Nunès, J. A., Vély, F.: Science 306, 1517-1519 (2004)
- [20] Brandt, C. S., Baratin, M., et al.: J. Exp. Med. 206, 1495-1503 (2009)
- [21] Li, Y., Wang, Q., Mariuzza, R. A.: J. Exp. Med. 208, 703-714 (2011)
- [22] Pende, D., Parolini, S., et al.: J. Exp. Med. 190, 1505-1516 (1999)
- [23] Neville, M. J., Campbell, R. D.: J. Immunol. 162, 4745-4754 (1999)
- [24] Sivakamasundari, R., Raghunathan, A., Zhangm C. Y., Chowdhury, R. R., Weissman, S. M.: Immunogenetics 51, 723-732 (2000)

- [25] Joyce, M. G., Tran, P., Zhuravleva, M. A., Jaw, J., Colonna, M., Sun, P. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 6223-6228 (2011)
- [26] Pogge von Strandmann, E., et al.: Immunity 27, 965-974 (2007)
- [27] Arnon, T. I., Achdout, H., et al.: Nat. Immunol. 6, 515-523 (2005)
- [28] Cantoni, C., Ponassi, M., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M., Bordo, D.: Structure 11, 725-734 (2003)
- [29] Foster, C. E., Colonna, M., Sun, P. D.: J. Biol. Chem. 278, 46081-46086 (2003)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]